



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Cirurgia I

### **Utilização de Plasma Enriquecido em Plaquetas na Prevenção da Deiscência Anastomótica Gastrointestinal**

Rita Alves Dias Avó Baião

---

**JULHO'2017**

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Cirurgia I

### **Utilização de Plasma Enriquecido em Plaquetas na Prevenção da Deiscência Anastomótica Gastrointestinal**

Rita Alves Dias Avó Baião

Orientador:

Dr. Nuno Carvalho

---

**JULHO'2017**

## ***Resumo***

---

A deiscência de anastomose é uma complicação maior da cirurgia gastrointestinal. O processo de regeneração da anastomose gastrointestinal partilha semelhanças com a pele, consistindo em hemostase, inflamação, proliferação e maturação. Neste processo, diversas células e moléculas estão envolvidas, sendo de relevar as plaquetas e os factores de crescimento. As plaquetas são fragmentos acelulares com múltiplos grânulos com um grande potencial em factores de crescimento tais como platelet-derived GF (PDGF), insulin-like GF (IGF1), transforming GF-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), vascular endothelial GF (VEGF), basic fibroblastic GF (bFGF) e epidermal GF (EGF). Estes factores promovem a re-epitelização, proliferação de células do mesênquima, recrutamento de fibroblastos e deposição de colagénio, proteína responsável pela força tênsil da anastomose.

O plasma enriquecido em plaquetas é um gel polimerizado viscoso, obtido pela centrifugação de sangue e tem uma elevada concentração de plaquetas e factores de crescimento. O uso deste gel em várias áreas cirúrgicas já é reconhecido, mas o seu potencial na prevenção da deiscência de anastomose na cirurgia gastrointestinal ainda se encontra em fases de estudo preliminares. O objectivo deste trabalho é avaliar os estudos existentes utilizando Plasma Enriquecido em Plaquetas no âmbito da cirurgia digestiva e, quanto a estes, avaliar os seus resultados, limitações, vantagens e conclusões.

## ***Abstract***

---

Anastomotic Leak is still a major complication in gastrointestinal surgery.

The healing process of the anastomosis is somewhat similar to the one in the skin, consisting in hemostasis, inflammation, proliferation and remodelling. In this process, many cells and molecules are involved, being platelets and growth factors important ones.

Platelets are acellular fragments with granules with a high yield in growth factors such as platelet-derived GF (PDGF), insulin-like GF (IGF1), transforming GF-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), vascular endothelial GF (VEGF), basic fibroblastic GF (bFGF) and epidermal GF (EGF). These promote reepithelization, mesenchymal proliferation, fibroblast recruitment and deposition of collagen, protein responsible for the tensile

strength of the anastomosis. Platelet Rich Plasma is a polymerized viscous gel obtained by centrifugation of whole blood and it has a high concentration of platelets and growth factors. The use of this gel in surgical areas has already established itself but its potential in preventing anastomotic leak in gastrointestinal surgery is still in a preliminary phase of study. The aim of this study is to ascertain the existing experimental studies with Platelet Rich Plasma in gastrointestinal surgery and evaluate its results, limitations, advantages and conclusions.

Palavras-Chave: PRP, platelet rich plasma, anastomotic leakage, regeneration, gastrointestinal.

O Trabalho Final foi escrito utilizando o antigo Acordo Ortográfico (1990).

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

## Índice

Resumo.....	3
Introdução .....	6
Objectivo .....	13
Métodos.....	13
Resultados .....	14
Discussão.....	19
Conclusão.....	22
Agradecimentos.....	23
Bibliografia .....	24

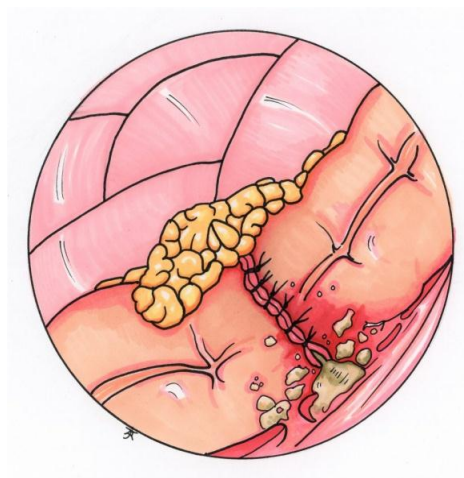
## ***Introdução***

---

A deiscência de anastomose (DA) é uma das principais complicações da cirurgia gastrointestinal, com uma incidência variável entre os 3 e os 15% (Guyton, Hyman, & Alverdy, 2016; Pommergaard, Achiam, & Rosenberg, 2012) e com taxas de morbidade e mortalidade importantes.

Embora não exista consenso na definição de deiscência, na maioria dos estudos é descrita como ruptura da continuidade da linha anastomótica de que resultará a passagem de conteúdo entérico para fora do lúmen do tracto digestivo. Este evento pode ter consequências mínimas, como a formação de abscesso que resolve espontaneamente, sem repercussão clínica, até a passagem de conteúdo livre para a cavidade peritoneal, com quadro de peritonite, eventual evolução para sépsis e disfunção múltipla de órgãos e morte.

A deiscência pode ser definida de acordo com critérios clínicos ou imagiológicos, o que obviamente condiciona os critérios de inclusão em estudos de incidência, factores de risco e de previsão de deiscência.



**Figura 1** (Korgaonkar, 1995)

Segundo a Sociedade Portuguesa de Cirurgia, a deiscência anastomótica existe “sempre que haja fuga de conteúdo entérico através da anastomose manifestando-se no local do dreno, na ferida operatória ou peri-anastomótica conduzindo a quadro séptico cuja gravidade pode conduzir à insuficiência multiorgânica; nos casos de suspeita clínica de deiscência anastomótica há necessidade de confirmação radiológica através de estudo contrastado e/ou TC associado a contraste”(Leite, 2014).

Tecnicamente, a deiscência é definida como a passagem de contraste observado em

exame de imagem ou como a ocorrência de abscessos que se formem peri-anastomóticos e se documentem em TC (Guyton et al., 2016).

As manifestações clínicas de DA gastrointestinal podem estar ausentes, ou seja, sem qualquer tradução clínica, ou ir desde dor, febre, diarreia, ileus, sépsis ou choque (Audett & Paquette, 2014; Guyton et al., 2016).

São múltiplos os factores de riscos actualmente conhecidos para ocorrência de DA, dependendo: do individuo, como a idade, comorbilidades maior prévias, estado nutricional, tabagismo; de factores associados à doença subjacente, como o estadio TNM, imunossupressão, radioterapia neoadjuvante; das condições peri-operatórias e técnica cirúrgica, como o nível de tensão a que está submetida a anastomose, grau de vascularização ou existência de isquémia, técnica usada (sutura manual ou mecânica), duração da cirurgia, hipotensão peri-operatória, perdas sanguíneas e necessidade transfusional ou a localização da anastomose (Bosmans, Jongen, Bouvy, & Derikx, 2015; Fujita, Torashima, Kuroki, & Eguchi, 2014; Turrentine et al., 2015). Existem assim factores de risco modificáveis, como a técnica de anastomose, na dependência do cirurgião e outros factores que não temos capacidade de alterar como, por exemplo, a idade.

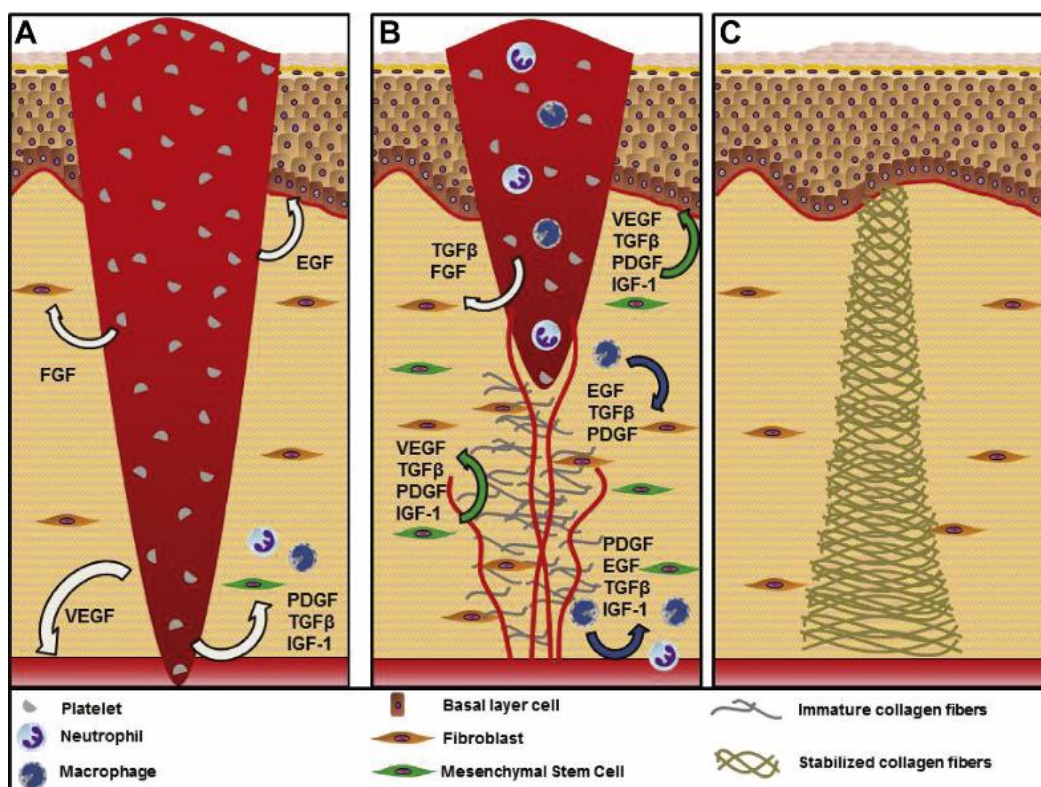
Embora não sejam considerados factor de risco, protocolos de antibioterapia endovenosa de largo espectro que não respeitem o microbioma comensal favorecem a colonização peri-operatória de espécies patogénicas associadas à DA, como *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Olivas et al., 2012). Apesar de se reconhecer estes organismos como factores de risco de DA, não se sabe exactamente o papel e peso de cada um deles na ocorrência desta complicação.

É interessante constatar que o conhecimento da regeneração tecidual em anastomoses gastrointestinais é limitado, em comparação com os modelos de cicatrização de feridas na pele, justamente pela dificuldade de acesso aos órgãos do sistema digestivo.

Apesar disso, em quase todos os tecidos moles, os processos biológicos de reparação tecidular seguem uma ordem similar, incluindo o tracto digestivo: hemostase, inflamação, proliferação e maturação ou *remodelling* (Bosmans et al., 2015; Hendriks & Mastboom, 1990).

Nos bordos da linha de sutura da anastomose, seja ela mecânica ou manual, vai ocorrer inflamação local com migração de neutrófilos, monócitos e macrófagos, aumento da permeabilidade vascular e migração de fibroblastos e precursores de células musculares lisas, proliferação de enterócitos com consequente reorganização do epitélio

e matriz extracelular (Hunt, 1990; Thompson, Chang, & Jobe, Blair A. Thompson, Eugene Y. Chang, 2006; Thornton & Barbul, 1997).



**Figura 2** (Fernandez-Moure et al., 2017)

Uma das várias diferenças entre a reparação da pele e das camadas do tracto gastrointestinal, reside na deposição do colagénio, teoricamente responsável pela força tênsil da anastomose (Christensen, Chemnitz, Christensen, & Oxlund, 1995). Não importa só a quantidade de colagénio que é depositado pelos fibroblastos e, no caso do tracto digestivo, também pelas células de músculo liso, o tipo e maturação de colagénio são igualmente importantes: na pele encontramos diferentes tipos de colagénio (I e III) comparativamente com o intestino em que, histologicamente, observamos colagénio dos tipos I, III e V (Bosmans et al., 2015).

A deposição de colagénio, ao nível do trato gastrointestinal, é ainda influenciada pela actividade dos macrófagos residentes na mucosa e pelos monócitos recrutados para o local de anastomose, em caso de libertação de lipopolissacarídeos bacterianos (Wu et al., 2014).

As bactérias entéricas, em caso de descontinuidade da mucosa, desencadeiam a ativação clássica de macrófagos, com a libertação subsequente de óxido nítrico e outras citocinas inflamatórias. Estudos prévios sugerem que a libertação de óxido nítrico diminui a síntese de colagénio em modelos de sépsis intra-abdominal (Thornton &



Barbul, 1997) e, por isso, a activação pela via pró-inflamatória dos macrófagos é prejudicial e desfavorece a força tênsil da anastomose.

Pensava-se então que a submucosa, pelo maior conteúdo em colagénio, fosse a camada mais importante na cicatrização da anastomose. No entanto, pelo papel que os macrófagos desempenham no balanço da actividade pró *versus* anti-inflamatória, a mucosa intestinal é a camada com maior importância na regeneração da anastomose precisamente por ser o maior reservatório de macrófagos no corpo humano (Bosmans et al., 2015).

Mais ainda, verificou-se que em ratinhos *knock-out* Muc2, em que foi silenciado o gene que traduz a Mucina 2, um dos principais componentes do muco intestinal, existe maior incidência de deiscência, o que sugere a importância duma mucosa íntegra na prevenção de deiscência, mais ainda, por ser o local onde se encontra todo o microbioma do tracto digestivo (Bosmans et al., 2015).

Relativamente à fase inflamatória, se o colagénio (na quantidade, tipo e maturação certa) é responsável pela maior força tênsil da anastomose, a actividade pró-inflamatória de collagenases será então um importante factor preditivo de *leak* da linha de sutura. Estas enzimas - que degradam o colagénio e, como tal, comprometem a integridade da anastomose - estão presentes na mucosa intestinal e a sua origem não é necessariamente bacteriana (Hawley, Faulk, Hunt, & Dunphy, 1970; Olivas et al., 2012).

Vários estudos já verificaram que a actividade das collagenases aumenta até ao 3º dia pós-operatório. Esta actividade aumentada verifica-se sobretudo no cólon, no entanto, não é exclusiva do local da anastomose (Hawley et al., 1970; Thompson et al., 2006; Thornton & Barbul, 1997).

A par da prevenção ou redução do peso dos factores de risco para a DA, cada vez mais se investiga o papel de apósitos e "colas", sintéticos e biológicos, como meio de melhorar a regeneração tecidual na linha de anastomose.

Uma das áreas de investigação mais profícuas é o plasma enriquecido em plaquetas (PRP) devido ao importante papel que as plaquetas têm nas diversas fases da regeneração tecidual, além da sua relevância na hemostase e angiogénese (Wasterlain, Braun, & Drago, 2012).

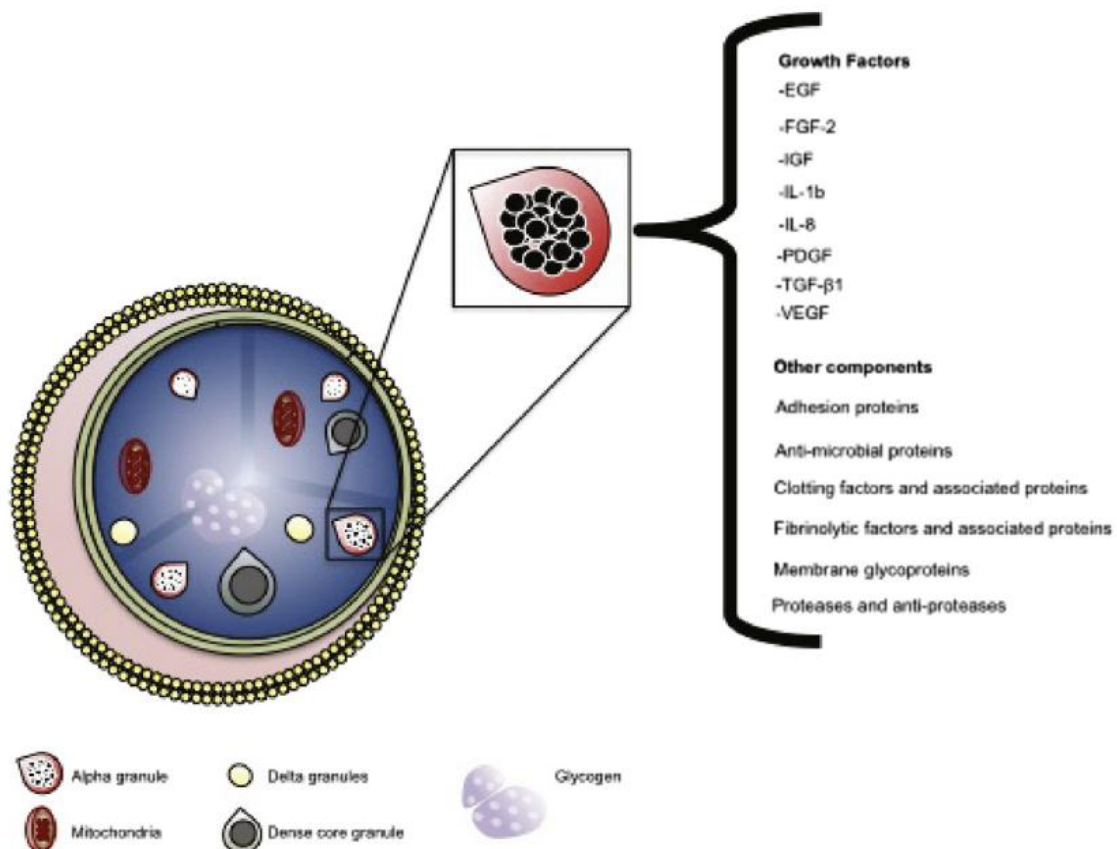
As plaquetas são o resultado da fragmentação de prolongamentos celulares não nucleados de megacariócitos que se encontram na medula óssea. São as células sanguíneas mais pequenas (3.60 x 0.7 µm), no entanto contêm um elevado conteúdo peptídico com função crucial em processos como hemostase, resposta imune inata,

regeneração tecidual e angiogénese. Estas moléculas proteicas estão divididas em dois tipos de grânulos, densos e alfa (Jurk, Ph, Kehrel, & Ph, n.d.; Sánchez-González, Méndez-Bolaina, & Trejo-Bahena, 2012).

Nos grânulos densos estão contidos ADP, ATP, serotonina e cálcio.

Nos grânulos alfa estão contidas a maioria das proteínas com função de sinalização, potencial mitogénico e inflamatório e, quando as plaquetas são activadas, seja por endotélio exposto ou agonistas fisiológicos como a trombina, libertam o seu conteúdo peptídico no local de lesão.

As substâncias com maior impacto no processo de regeneração de lesão são factores de crescimento (GF) como platelet-derived GF (PDGF), insulin-like GF (IGF1), transforming GF-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), vascular endothelial GF(VEGF), basic fibroblastic GF (bFGF) e epidermal GF(EGF). Estes factores de crescimento não só potenciam a proliferação e remodelação local, como também promovem o recrutamento e a diferenciação de outras células envolvidas na cascata de eventos que levam a uma correcta cicatrização tecidual (Sánchez-González et al., 2012).



**Figura 3** (Fernandez-Moure et al., 2017)

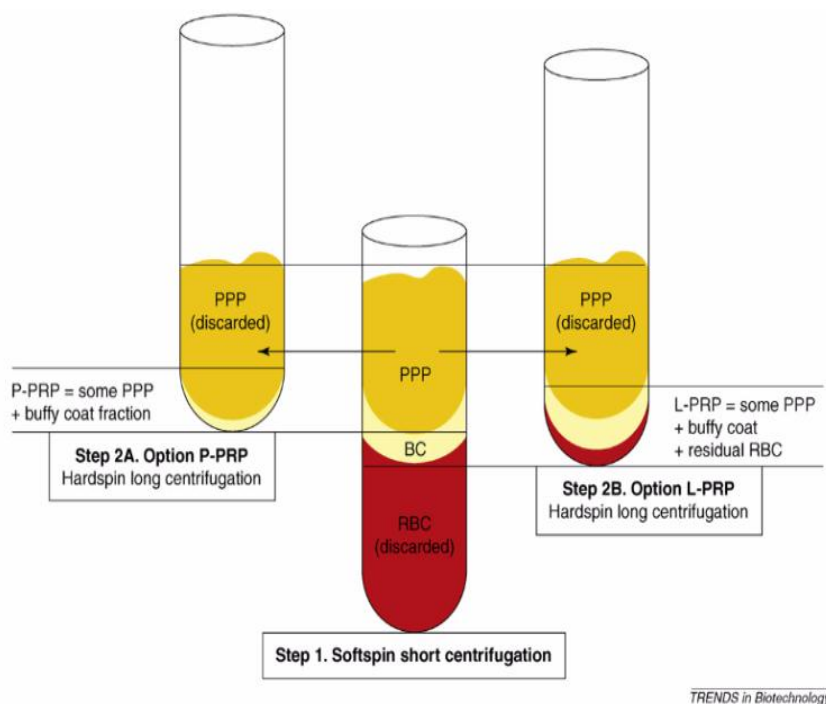
Considerando-se as diversas fases da reparação tecidual, hemostase, inflamação, proliferação e remodelação, os diferentes factores de crescimento presentes nos

grânulos alfa vão desempenhar funções interdependentes e sequenciais.

Alguns factores de crescimento como o IGF-1, PDGF, VEGF e TGF-B estão envolvidos em mais do que uma fase deste processo, desde angiogénese à quimiotaxia de macrófagos, monócitos, fibroblastos e células musculares lisas (Fernandez-Moure et al., 2017; Sánchez-González et al., 2012).

Concretamente na regeneração do epitélio intestinal, sabe-se que a via de sinalização do TGF-B1 está envolvida na reparação celular mas não na migração e proliferação de enterócitos. Por outro lado, o sistema do PDGF, constituído por quatro isoformas, possui derivados polipeptídicos responsáveis pela sinalização de tirosinas-cinase e proliferação de células de tecido conjuntivo, pela motilidade de células do mesênquima, fibroblastos, células musculares lisas e do endotélio capilar, e ainda pela reepitelização do epitélio, com proliferação de enterócitos (Iizuka & Konno, 2011; Sánchez-González et al., 2012).

O *rationale* da investigação no PRP é que este consiste numa substância, como um gel polimerizado viscoso, que se coloca sobre o local de sutura da anastomose, cuja concentração em plaquetas e potencial em factores de crescimento pode estar aumentado até sete vezes em comparação com sangue não centrifugado e reforça assim a sutura anastomótica (Casella et al., 2015).



**Figura 4** (Dohan Ehrenfest, Rasmusson, & Albrektsson, 2009)

Os protocolos existentes para execução de PRP possuem algumas variações, mas o

princípio base é semelhante. O sangue do doente (caso seja possível PRP autólogo) é colhido para tubos com anticoagulante (citrato de sódio, p.e.), para que a libertação de factores de crescimento comece apenas aquando da colocação do apósito no local de sutura. Esta colheita ocorre imediatamente antes ou durante a cirurgia e o sangue é processado por centrifugação.

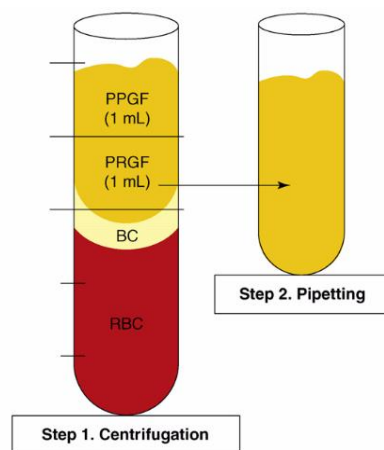
A primeira centrifugação tem como função separar o sangue em três camadas, uma fase eritrocitária que corresponde à camada mais densa e, por isso, inferior, uma fase celular correspondente ao “leito” leucocitário e plaquetário (*buffy coat*, BC) e uma fase acelular, a camada superior, correspondente ao plasma pobre em plaquetas (PPP).

O próximo passo do procedimento varia consoante os protocolos. Para obter um PRP puro (menor conteúdo leucocitário) pode remover-se o leito eritrocitário e a segunda centrifugação é feita contendo apenas o BC superficial (menor teor leucocitário) e o PPP, resultando em duas camadas: o PPP que é descartado e o PRP puro.

Para obter L-PRP (maior conteúdo leucocitário) remove-se a maioria do leito eritrocitário mas deixando alguns eritrócitos remanescentes, a totalidade do BC e o PPP para a segunda centrifugação, sendo que neste segundo tubo obtém-se uma camada de PPP, que é descartada e o L-PRP (Dohan Ehrenfest et al., 2009).

Por fim é adicionado uma substância que active o PRP (cloreto de cálcio, gluconato de cálcio, trombina/ $\text{Ca}^{2+}$ , p.e.) e é formado um gel que se aplica sobre a linha de sutura (Fernandez-Moure et al., 2017; Sánchez-González et al., 2012; Wasterlain et al., 2012).

A maior parte dos protocolos documentados na literatura não descreve um sistema de separação celular que retire completamente a fracção leucocitária e, por isso, na realidade, aquilo que é descrito como PRP é na realidade PRP rico em leucócitos (L-PRP) (Wasterlain et al., 2012).



TRENDS in Biotechnology

**Figura 5** (Dohan Ehrenfest et al., 2009)

Sendo o local de descontinuidade gastrointestinal exposto a este apósito, é facilitada a difusão dos factores de crescimento que promovem a correcta integridade da linha anastomótica e, consequentemente, previnem complicações como a DA.

## ***Objectivo***

---

O objectivo deste trabalho é averiguar os estudos feitos com PRP no âmbito da cirurgia digestiva e, quanto a estes, avaliar os seus resultados, limitações, vantagens e conclusões.

## ***Métodos***

---

Como motores de busca foram usados: Biblioteca do Conhecimento Online (<http://www.b-on.pt/>); ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>) e PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Foram usadas como palavras-chave: ((PRP OR platelet rich plasma OR platelet gel) AND (anastomosis OR anastomotic) AND (leakage OR healing OR regeneration) AND (gastrointestinal OR intestinal OR colon OR colonic OR colorectal)).

A pesquisa dos artigos a discutir foi efectuada entre Outubro de 2016 e Março de 2017 e foram incluídos os artigos publicados entre os anos 2006 e 2016.

Como critérios de elegibilidade foram definidos: estudos publicados em revistas académicas; estudos apenas no âmbito da cirurgia gastrointestinal, seja por laparotomia, laparoscopia ou via endoscópica; estudos em animais e humanos; estudos em que se usasse como apósito principal plasma rico em plaquetas.

Como critérios de exclusão foram definidos: estudos em que se usasse apósitos de fibrina, derivados de cianoacrilato, polietilenoglicol, ácido de poliglicólico, ou outros que não PRP; estudos que usassem PRP com sangue alogénico, no caso de estudos em humanos.

## Resultados

Os artigos elegíveis estão sistematizados na Tabela seguinte, por ordem cronológica.

Ano	Autor	Modelo	Amostra	Procedimento cirúrgico	Resultado
2006	Brady et al.	Humano	10	Bypass gástrico (Roux-en-Y)	Ausência de leak (imagiologicamente) ou complicações pós-operatórias
2008	Yol et al.	Rato	30	Anastomose cólica	Níveis de Pressão de Ruptura Anastomótica (PRA), Hidroxiprolina Tecidual e Contagem de Fibroblastos superior no grupo submetido a PRP
2010	Fresno L, Fondevila D, Bambo O, Chacaltana A, García F	Porco	35	Anastomose entérica topo a topo	Sem efeito significativo na PRA, no grupo com PRP aumentou granulação tecidual e fibrose.
2012	Yamaguchi, Terashima, Yoneyama, Tadano, & Ohkohchi	Rato	48	Anastomose entérica topo a topo	Efeito positivo na PRA, hidroxiprolina tecidual e avaliação histopatológica: efeito dependente da concentração
2014	Zhou et al.	Rato	30	Anastomose cólica topo a topo + abdómen aberto	Efeito positivo na PRA, hidroxiprolina tecidual e avaliação histopatológica
2015	Casella et al.	Humano	20	Gastrectomia vertical calibrada ( <i>sleeve</i> )	Ausência de leak (imagiologicamente) ou complicações pós-operatórias
2016	Sozutek et al.	Rato	50	Anastomose cólica topo a topo + sépsis	Resultados superiores nos grupos controlo+PRP e sépsis+PRP comparativamente aos grupos sem PRP.

Os resultados são sumarizados de acordo com os modelos utilizados.

### **Estudos experimentais em animais:**

#### *Ratos*

- Effects of Platelet Rich Plasma on Colonic Anastomosis (Yol et al., 2008)

No estudo de 2008 de You. *et al*, foi investigado o efeito do PRP autólogo em anastomose cólica, sendo os resultados avaliados através da Pressão de Ruptura Anastomótica (PRA), níveis de Hidroxiprolina Tecidual (HPT) e avaliação histopatológica com contagem de fibroblastos em campo de grande ampliação.

Os ratos foram divididos em três grupos de dez: grupo de PRP (n=10), um grupo controle (n=10) e um grupo onde foi aplicado Bioglue® (n=10).

Verificaram-se valores superiores de PRA, HPT e maior contagem de fibroblastos no grupo alvo de PRP, com significado estatístico.

- Effects of Platelet Rich Plasma on Intestinal Anastomotic Healing in Rats: Concentration is a Key Factor (Yamaguchi et al., 2012)

Avalia o uso de apósitos de PRP alogénico em diferentes concentrações plaquetárias em anastomose jejunal proximal. Foram utilizados como *outcomes* a medição da PRA e HPT. As preparações de PRP foram divididas em grupo de controle, plasma pobre em plaquetas (PPP), PRP em baixa concentração (23106 plaquetas/mm<sup>3</sup>) e PRP em alta concentração (53106 plaquetas/mm<sup>3</sup>).

Cinco dias após cirurgia, verificaram-se valores significativamente superiores de PRA e HPT no grupo de baixa concentração de PRP. O grupo de PRP em alta concentração apresentou valores bastante inferiores nestas duas variáveis, comparativamente com os restantes. O grupo de PPP vs. Controlo não apresentou diferença estatística significativa.

- Protection of Colonic anastomosis with platelet rich plasma gel in the open abdomen (Zhou et al., 2014)

Em 2014, fez o primeiro estudo do uso de PRP autólogo em anastomose cólica, num modelo de abdómen aberto. Três grupos de dez ratos foram submetidos a anastomose cólica. O grupo controle foi submetido a anastomose e encerramento da parede abdominal, o segundo grupo foi submetido a anastomose sem encerramento da parede (OA) e o terceiro grupo foi submetido a anastomose cólica com colocação de PRP e

ficou com abdómen aberto (OA + PRP).

Os *outcomes* avaliados foram a perda ponderal, PRA, HPT e avaliação histológica do tecido peri-anastomótico com colorações de hematoxilina e eosina e tricrómio de Masson.

O grupo OA apresentou perda ponderal, baixa PRA e HPT e na avaliação histopatológica foi observada baixa deposição de colagénio. Não houve diferença estatística entre o grupo AO + PRP e o grupo controlo.

- The Effect of Platelet-Rich-Plasma on the Healing of Left Colonic Anastomosis in a Rat Model of Intra-Abdominal Sepsis (Sozutek et al., 2016)

Avalia o uso de PRP alogénico em anastomose no cólon descendente num modelo de sépsis intra-abdominal, por punção cecal e indução de peritonite.

Foram utilizados cinco dezenas de ratos: dez ratos para preparação de PRP e os restantes quarenta divididos em quatro grupos de dez. Utilizou-se, assim, um grupo controlo, em que foi feita anastomose sem uso de PRP, um grupo em que foi feita anastomose e induzida sépsis sem uso de PRP (*S*), um grupo onde foi feita anastomose com uso de PRP sem provocar sépsis (*PRP*) e, por fim, um grupo onde foi feita anastomose e indução de sépsis com uso de PRP (*S+PRP*).

No sétimo dia pós-cirúrgico, avaliaram-se a alteração ponderal, PRA, HPT e avaliação histopatológica.

Não houve diferença estatística quanto à alteração ponderal nos quatro grupos.

No grupo *PRP*, a PRA e HPT foram significativamente superiores comparativamente aos outros grupos. No grupo de *S+PRP*, a PRA e HPT estavam ao nível do grupo controlo. Quanto à avaliação histopatológica, o grupo *PRP* apresentou maior deposição de colagénio.

#### *Porcos*

- Effects of platelet rich plasma on intestinal wound healing in pigs (Fresno et al., 2010)

No estudo de Fresno *et al.* (2010) foram utilizados trinta e cinco porcos submetidos a dupla enterectomia. Uma secção de jejuno foi re-anastomosada com sutura simples - servindo de controlo - e uma segunda secção de jejuno, a 50 cm distais à primeira enterectomia, foi re-anastomosada com sutura e aplicação de PRP autólogo. Os trinta e cinco porcos foram divididos em dois grupos, um para avaliação histopatológica,



constituído por cinco grupos de três animais (para eutanásia às 24h, 48h, 72h, 96h e 7 dias pós-cirurgia), e outro grupo para avaliação da Força de Ruptura Anastomótica (FRA), constituído por dois grupos de dez animais (para eutanásia 3 dias e 7 dias pós-cirurgia).

Na avaliação histopatológica, foram feitas colorações com hematoxilina e eosina, tricrómio de Masson e, ainda, preparação imunohistoquímica para marcação de um antígeno relacionado com o Factor VIII.

Quanto à avaliação histopatológica, embora não tenha sido feita quantificação, 7 dias após a cirurgia, observou-se maior quantidade de tecido de granulação com fibrose nas amostras com PRP em comparação com as amostras controlo. Nenhuma diferença quantitativa foi observada utilizando tricrómio de Masson e imunohistoquímica para o antígeno relacionado com o Factor VIII.

Em relação à FRA, embora fosse ligeiramente superior nas amostras com PRP, não adquiriu significado estatístico.

#### ***Case series em Humanos:***

- Use of Autologous Platelet Gel in Bariatric Surgery (Brady et al., 2006)

Brady, C. *et al.* descreveu em 2006 um *case series* de dez doentes com obesidade mórbida (IMC média de 44.5 kg/m<sup>2</sup>) e idade média de 43 anos, submetidos a *bypass* gástrico laparoscópico, utilizando a técnica de Roux-en-Y. Após as anastomoses, o gel de PRP autólogo foi colocado na linha de gastro-jejunostomia, na jejuno-jejunostomia latero-lateral e na linha de sutura mecânica gástrica.

No primeiro dia pós-cirurgia, não se verificou perda de contraste administrado por via oral em nenhum doente. O controlo da anastomose foi efetuado, de novo, ao sétimo dia, também sem evidência de extravasamento de contraste. Da mesma forma, não se verificou em nenhum doente estenose gástrica, necessidade de reintervenção por hemorragia ou transfusão sanguínea, deiscência anastomótica, infeções, fosse intra-abdominal, peritonite ou septicémia em nenhum doente.

Apenas um doente foi reoperado por hérnia encarcerada no local de inserção do *trocart*, com necessidade de laparotomia exploradora.

- Use of Platelet Rich Plasma to Reinforce the Staple line during laparoscopy sleeve gastrectomy: feasibility study and preliminary outcome (Casella et al., 2015)

O estudo de Casella *et al.* (2015) avalia a exequibilidade do reforço da linha de

sutura mecânica com PRP autólogo para prevenção de deiscência anastomótica.

Vinte doentes com obesidade mórbida (IMC médio de 42.3Kg/m<sup>2</sup>) e idade média de 44.6 anos foram submetidos a gastrectomia vertical (*sleeve*) por laparoscopia, sendo o gel de PRP colocado na porção superior da linha de sutura, cerca de 1,5cm do ângulo de His, onde termina a linha de sutura mecânica.

Não houve complicações intra ou pós-operatórias. Não se verificou deiscência anastomótica, avaliada clínica e imagiologicamente (ecografia abdominal e estudo com contraste) até aos doze meses de seguimento. Não houve sinais de rejeição ou infecção associados ao PRP.

Um doente apresentou subida de temperatura (ainda que inferior a 38°C), sem leucocitose associada, que cessou três dias após terapêutica antibiótica com ampicilina e sulbactam.

O custo associado à produção de PRP, por cirurgia, foi avaliado em 15€ por procedimento. O tempo médio de cirurgia (85±31 minutos) foi avaliado pelos autores como “não sendo muito superior” ao tempo médio por procedimento do cirurgião (750 casos)”.

## Discussão

O amplo estudo e uso de PRP em áreas médico-cirúrgicas, como dermatologia, cirurgia plástica ou ortopedia, levantou questões acerca do papel de apósitos ou “colas” noutras áreas relacionadas, tais como a cirurgia digestiva, em particular na anastomose do tubo digestivo (Carter, Fyelling, & Parnell, 2011; P. A. Everts, Jakimowicz, et al., 2007; P. A. Everts, Overdevest, et al., 2007; Wasterlain et al., 2012).

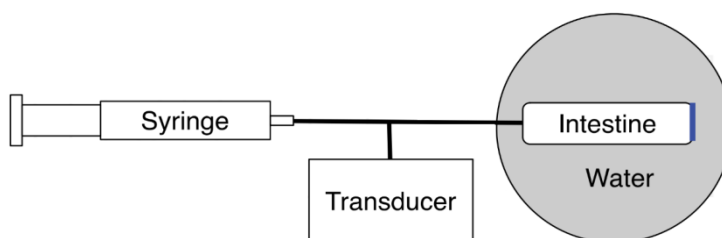
Embora o papel benéfico do PRP seja incontestável em várias áreas cirúrgicas, está longe de ser completamente compreendida a sua vantagem na prevenção da deiscência anastomótica gastrointestinal.



**Figura 6** (Kawasaki et al., 2007)

Em relação aos *outcomes* avaliados a nível de anastomose gastrointestinal, o *gold-standard* é a medição da Pressão de Ruptura Anastomótica (PRA / *Anastomotic Bursting Pressure*) - que mede a pressão intra-luminal necessária para causar ruptura da linha anastomótica -, e a quantificação dos níveis de Hidroxiprolina Tecidual (HPT).

A Força de Ruptura Anastomótica (*Anastomotic Breaking Strength*), é um parâmetro que avalia a resistência longitudinal de uma anastomose com um dinamómetro.



**Figura 7** (Kawasaki et al., 2007)

Embora o uso da PRA para avaliação da regeneração e integridade da anastomose seja alvo de críticas, é a forma de medição da qualidade da anastomose mais

amplamente utilizada. Sabe-se que a PRA reflecte melhor a integridade da anastomose e o risco de deiscência, sendo que esta deve ser medida na fase inflamatória da regeneração da anastomose (até 4 dias pós-cirurgia). A FRA traduz a força da anastomose e por isso reflecte a capacidade de união da sutura, sendo idealmente medida na fase proliferativa e de maturação.(De Castro Durães, Ferreira Ribeiro Durães, De Campos Lobato, Gonçalves De Oliveira, & Batista De Sousa, 2013; Ikeuchi et al., 1999; Son et al., 2014)

A avaliação histopatológica e recurso a imunohistoquímica são também variáveis consideradas, no entanto com menor frequência, por dificuldade de quantificação e ausência de classificações padrão universais.

A Hidroxiprolina Tecidual é uma variável intermédia ou secundária (*surrogate outcome*), pois sendo o aminoácido precursor do colagénio, mede indirectamente a quantidade desta proteína produzido pelos fibroblastos e necessário à regeneração da zona de sutura.

Todos os estudos experimentais em ratos favoreceram o uso de PRP como selante que melhoraria a qualidade da regeneração da linha anastomótica. You *et al.* corrobora o que já foi estudado noutras áreas, tendo obtido valores de PRA, HPT e maior contagem de fibroblastos teciduais no grupo alvo de PRP.

O estudo de 2010 de Yamaguchi *et al.* é o primeiro a abordar de forma sistemática o método de execução de PRP e a concentração plaquetária como variável que pode complicar o processo regenerativo no âmbito de cirurgia gastrointestinal. Introduziu na investigação sobre o uso de PRP a ambiguidade das plaquetas como tendo um efeito pro *versus* anti-inflamatório.

Verificou-se que um aumento da concentração plaquetária base de 4 a 5 vezes, considerado como a concentração “terapêutica” do PRP (Marx, 2004), levou a uma diminuição da PRA, inferior ainda ao grupo controlo e grupo de plasma pobre em plaquetas (PPP). Este efeito negativo pode ser consequência do uso de sangue alogénico ou então do modelo animal em questão, mas, de qualquer das formas, merece atenção quando se progredir para estudos com PRP autólogo e em humanos.

O sucesso ou fracasso da aplicação de PRP pode residir justamente no método de preparação e na concentração plaquetária. Como o pretendido no estudo de Yamaguchi *et al.* era avaliar a importância da concentração plaquetária nos efeitos do PRP, o *buffy coat* foi completamente eliminado para diminuir o número de variáveis, nomeadamente o teor leucocitário. No entanto, Everts *et al.* (P. A. M. Everts et al., 2006) defendem que

poderão existir vantagens da inclusão de maior conteúdo leucocitário no gel de PRP pela sua acção antimicrobiana.

Bo Zhou *et al.* desenharam um estudo em que é colocado PRP numa anastomose em risco de deiscência - por se encontrar num modelo de abdómen aberto - obtendo neste grupo resultados semelhantes ao grupo submetido a anastomose e encerramento da parede abdominal, o que apoia o uso de PRP em condições desfavoráveis. Assim, um ambiente com risco de contaminação séptica que não favorece a linha anastomótica é revertido a um ambiente similar às condições assépticas de cirurgia electiva.

Zhou *et al.* e Sozutek *et al.* desenharam estudos que criam condições desfavoráveis (modelos de abdómen aberto e de sépsis), aumentando a probabilidade de ocorrência de deiscência anastomótica. No modelo de sépsis intra-abdominal (Sozutek *et al.*, 2016) retiram-se duas conclusões importantes: o grupo submetido a anastomose com o selante de PRP e posterior punção cecal e peritonite conseguiu obter regeneração da linha de sutura ao mesmo nível de um ambiente asséptico, sem o uso de apósitos. Este facto apoia o uso deste tipo de selante em ambientes cirúrgicos em que se prevê um risco de contaminação intra-abdominal elevado. Por outro lado, o uso de PRP num ambiente asséptico levou a uma maior qualidade da linha anastomótica, o que, considerando o custo-benefício e tempo cirúrgico utilizado, pode levar a que este tipo de selantes biológicos se torne o *gold- standard* em cirurgia digestiva como medida de prevenção da deiscência.

O estudo de Fresno *et al.*, tem limitações científicas, em relação à quantificação objectiva do conteúdo em colagénio e tecido de granulação, não permitindo retirar conclusões a nível histopatológico sobre o papel do PRP na linha de sutura. No entanto, as medições efectuadas ao nível da FRA não obtiveram significado estatístico e, por isso, é o único estudo em animais que não suporta o uso de PRP como selante, pela ausência de benefício objectivo. É de relevar que é o único estudo neste âmbito que não suporta o uso de PRP e que não utiliza a PRA mas a FRA como *outcome* quantificável, o que suscita a questão: não será necessário uma reprodução dos estudos já feitos em ratos mas com a medição da FRA, além da PRA?

Os *case reports* realizados em humanos têm diversas limitações pelo facto de não serem estudos comparativos (não controlados) e não randomizados. Embora não permitam retirar conclusões científicas sobre os benefícios de PRP na linha anastomótica, avaliam a questão da exequibilidade clínica deste procedimento, nomeadamente o estudo de Casella *et al.*.

Ao tentar introduzir um protocolo preventivo, em qualquer área médica, o tempo e custo são sempre questões que podem ser limitativas. No estudo de Casella *et al.* esses dois parâmetros são avaliados.

Após a curva de aprendizagem, é referido que o tempo médio cirúrgico não foi muito superior ao tempo médio do cirurgião. Também Yamaguchi *et al.* sugerem que, quando preparado o PRP manualmente com centrifugadoras dentro do bloco operatório, o protocolo de preparação é inferior a uma hora. Assim, em cirurgias com tempo médio superior a uma hora, o processo será apenas dependente da própria duração da cirurgia, após aprendizagem e existindo recursos humanos dedicados à preparação do selante no bloco operatório.

Embora o custo apresentado por Casella *et al.* seja apelativo, poderá variar entre centros hospitalares, dependendo do material de centrifugação em questão e dos recursos humanos necessários. Não obstante, após a aquisição do material, o custo poderá vir a ser colmatado pelo amplo uso em centros de elevado volume cirúrgico e pela própria prevenção da deiscência anastomótica e diminuição da necessidade de reintervenção, no caso de complicações pós-operatórias.

## ***Conclusão***

---

Ainda é demasiado precoce para se pensar na instituição de PRP como procedimento preventivo generalizado da DA. Os estudos até agora efectuados colocam mais questões do que prestam esclarecimentos.

Terão os leucócitos um efeito superior ao que se pensa na regeneração da anastomose? Como balancear a concentração das plaquetas de forma a obter um processo inflamatório regenerativo equilibrado? Será o uso de PRP alogénico tão vantajoso como o autólogo? Estarão os *outcomes* utilizados a criar resultados demasiados optimistas?

Futuros estudos comparando diferentes concentrações plaquetárias e leucocitárias, sangue autólogo *versus* sangue alogénico e usando, além da PRA, a FRA como *outcome* poderão dar algumas respostas na temática dos apósitos biológicos.

O PRP está longe de ser considerado a “panaceia” da prevenção da deiscência anastomótica mas é, sem dúvida, um campo a investir, principalmente pela ausência de efeitos adversos que até agora não foram descritos e pela atraente relação custo-benefício.

## *Agradecimentos*

---

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao meu orientador, Dr. Nuno Carvalho, pela confiança no tema, pelo apoio e ambição de ir mais longe em futuros estudos. Espero que continuemos a colaborar nos próximos anos. Ao Prof. Dr. Paulo Costa gostaria de agradecer a disponibilidade.

Aos meus Professores Dr. Pedro Ferreira, Dr. Carlos Leichsenring, Dr. Manuel Morales, Dr. Nicola De'Angelis e à Dra. Barbara Hersant, onde quer que estejam, obrigado.

O maior agradecimento é à minha família e ao André. São a minha inspiração e nunca me cortaram as asas, mesmo nos voos mais improváveis. Foram eles que permitiram que ingressasse no Programa Erasmus, onde, entre outras descobertas, pude conhecer as aplicações do PRP e ver a Cirurgia com outros olhos.

## Bibliografia

---

- Audett, M. C., & Paquette, I. M. (2014). Intraoperative and postoperative diagnosis of anastomotic leak following colorectal resection. *Seminars in Colon and Rectal Surgery*, 25(2), 54–57. <https://doi.org/10.1053/j.scrs.2014.04.001>
- Bosmans, J. W. A. M., Jongen, A. C. H. M., Bouvy, N. D., & Derikx, J. P. M. (2015). Colorectal anastomotic healing: why the biological processes that lead to anastomotic leakage should be revealed prior to conducting intervention studies. *BMC Gastroenterology*, 15(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0410-3>
- Brady, C., Vang, S., Christensen, K., Isler, J., Vollstedt, K., & Holt, D. (2006). Use of autologous platelet gel in bariatric surgery. *The Journal of Extra-Corporeal Technology*, 38(2), 161–164. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16921691](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16921691)
- Carter, M. J., Fylling, C. P., & Parnell, L. K. S. (2011). Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty*, 11, e38. <https://doi.org/papers3://publication/uuid/1EA2CFAD-571B-40C9-AE35-5A7D3DE3C6B0>
- Casella, G., Soricelli, E., Genco, A., Ferrazza, G., Basso, N., & Redler, A. (2015). Use of Platelet-Rich Plasma to Reinforce the Staple Line During Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: Feasibility Study and Preliminary Outcome. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques*, 25(3), 222–227. <https://doi.org/10.1089/lap.2014.0329>
- Christensen, H., Chemnitz, J., Christensen, B. C., & Oxlund, H. (1995). Collagen structural organization of healing colonic anastomoses and the effect of growth hormone treatment. *Diseases of the Colon & Rectum*, 38(11), 1200–1205. <https://doi.org/10.1007/BF02048337>
- De Castro Durães, L., Ferreira Ribeiro Durães, E., De Campos Lobato, L. F., Gonçalves De Oliveira, P., & Batista De Sousa, J. (2013). Correlation between bursting pressure and breaking strength in colonic anastomosis. *Acta Cirúrgica Brasileira / Sociedade Brasileira Para Desenvolvimento Pesquisa Em Cirurgia*, 28(6), 447–52. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502013000600008>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, 27(3), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
- Everts, P. A., Jakimowicz, J. J., Van Beek, M., Schönberger, J. P. A. M., Devilee, R. J. J., Overvest, E. P., ... Van Zundert, A. (2007). Reviewing the structural features of autologous platelet-leukocyte gel and suggestions for use in surgery. *European Surgical Research*, 39(4), 199–207. <https://doi.org/10.1159/000101743>
- Everts, P. A. M., Knape, J. T. A., Weibrich, G., Schönberger, J. P. A. M., Hoffmann, J., Overvest, E. P., ... van Zundert, A. (2006). Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *The Journal of Extra-Corporeal Technology*, 38(2), 174–87. <https://doi.org/papers3://publication/uuid/4DD45207-6F24-4DC6-A294-311AD975A9E9>
- Everts, P. A., Overvest, E. P., Jakimowicz, J. J., Oosterbos, C. J., Schönberger, J. P., Knape, J. T., & Van Zundert, A. (2007). The use of autologous platelet-leukocyte gels to enhance the healing process in surgery, a review. *Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques*, 21(11), 2063–2068. <https://doi.org/10.1007/s00464-007-9293-x>



- Fernandez-Moure, J. S., Van Eps, J. L., Cabrera, F. J., Barbosa, Z., Medrano del Rosal, G., Weiner, B. K., ... Tasciotti, E. (2017). Platelet-rich plasma: a biomimetic approach to enhancement of surgical wound healing. *Journal of Surgical Research*, 207, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.08.063>
- Fresno, L., Fondevila, D., Bambo, O., Chacaltana, A., García, F., & Andaluz, A. (2010). Effects of platelet-rich plasma on intestinal wound healing in pigs. *Veterinary Journal*, 185(3), 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.06.009>
- Fresno L, Fondevila D, Bambo O, Chacaltana A, García F, A. A. (2010). Intestinal anastomosis wound healing after platelet- rich plasma (PRP) application on pigs. *Vet J*, 185(3), 322–7.
- Fujita, F., Torashima, Y., Kuroki, T., & Eguchi, S. (2014). The risk factors and predictive factors for anastomotic leakage after resection for colorectal cancer: Reappraisal of the literature. *Surgery Today*, 44(9), 1595–1602. <https://doi.org/10.1007/s00595-013-0685-3>
- Guyton, K. L., Hyman, N. H., & Alverdy, J. C. (2016). Prevention of Perioperative Anastomotic Healing Complications: Anastomotic Stricture and Anastomotic Leak. *Advances in Surgery*, 50(1), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.yasu.2016.03.011>
- Hawley, P. R., Faulk, W. P., Hunt, T. K., & Dunphy, J. E. (1970). Collagenase activity in the gastro??intestinal tract. *British Journal of Surgery*, 57(12), 896–900. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800571206>
- Hendriks, T., & Mastboom, W. J. B. (1990). Healing of experimental intestinal anastomoses - Parameters for repair. *Diseases of the Colon & Rectum*, 33(10), 891–901. <https://doi.org/10.1007/BF02051930>
- Hunt, T. K. (1990). Basic principles of wound healing. *Journal of Trauma-Injury, Infection, and Critical Care*. Retrieved from [http://journals.lww.com/jtrauma/Abstract/1990/12001/Basic\\_Principles\\_of\\_Wound\\_Healing.25.aspx](http://journals.lww.com/jtrauma/Abstract/1990/12001/Basic_Principles_of_Wound_Healing.25.aspx)
- Iizuka, M., & Konno, S. (2011). Wound healing of intestinal epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology*, 17(17), 2161–2171. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i17.2161>
- Ikeuchi, D., Onodera, H., Aung, T., Kan, S., Kawamoto, K., Imamura, M., & Maetani, S. (1999). Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. *Digestive Surgery*, 16(6), 478–485. <https://doi.org/10.1159/000018773>
- Jurk, K., Ph, D., Kehrel, B. E., & Ph, D. (n.d.). Platelets : Physiology and Biochemistry. Kawasaki, K., Fujino, Y., Kanemitsu, K., Goto, T., Kamigaki, T., Kuroda, D., & Kuroda, Y. (2007). Experimental evaluation of the mechanical strength of stapling techniques. *Surgical Endoscopy*, 21(10), 1796–1799. <https://doi.org/10.1007/s00464-007-9265-1>
- Korgaonkar, N. M. M. D. (1995). Anastomotic Leak. Retrieved from <http://teachmesurgery.com/perioperative/gastrointestinal/anastomotic-leak/>
- Leite, J. (2014). Registo do Cancro do Recto em Portugal. Retrieved from <http://www.spcir.com/registos-nacionais/definicao/>
- Marx, R. E. (2004). Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62(4), 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2003.12.003>
- Olivas, A. D., Shogan, B. D., Valuckaite, V., Zaborin, A., Belogortseva, N., Musch, M., ... Alverdy, J. C. (2012). Intestinal Tissues Induce an SNP Mutation in *Pseudomonas aeruginosa* That Enhances Its Virulence: Possible Role in

- Anastomotic Leak. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044326>
- Pommergaard, H. C., Achiam, M. P., & Rosenberg, J. (2012). External coating of colonic anastomoses: A systematic review. *International Journal of Colorectal Disease*, 27(10), 1247–1258. <https://doi.org/10.1007/s00384-012-1547-y>
- Sánchez-González, D. J., Méndez-Bolaina, E., & Trejo-Bahena, N. I. (2012). Platelet-rich plasma peptides: Key for regeneration. *International Journal of Peptides*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/532519>
- Son, K. H., Jeong, H. W., Jung, W. W., Kim, H. S., Lee, S. K., Kim, K. T., ... Lee, S. H. (2014). The use of collagen content as determined by spectral domain polarization-sensitive optical coherence tomography to assess colon anastomosis healing in a rat model. *European Surgical Research*, 52(1–2), 32–40. <https://doi.org/10.1159/000358057>
- Sozutek, A., Colak, T., Cetinkunar, S., Reyhan, E., Irkorucu, O., Polat, G., & Cennet, A. (2016). The Effect of Platelet-Rich-Plasma on the Healing of Left Colonic Anastomosis in a Rat Model of Intra-Abdominal Sepsis. *Journal of Investigative Surgery*, 29(5), 294–301. <https://doi.org/10.3109/08941939.2015.1111473>
- Thompson, S. K., Chang, E. Y., & Jobe, Blair A. Thompson, Eugene Y. Chang, B. A. J. (2006). Clinical Review: Healing in Gastrointestinal Anastomoses, Part I. *Microsurgery*, 26, 131–136. <https://doi.org/10.1002/micr.20197>
- Thornton, F. J., & Barbul, A. (1997). Healing in the gastrointestinal tract. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 549–574. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70568-5](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70568-5)
- Turrentine, F. E., Denlinger, C. E., Simpson, V. B., Garwood, R. A., Guerlain, S., Agrawal, A., ... Jones, R. S. (2015). Morbidity, mortality, cost, and survival estimates of gastrointestinal anastomotic leaks. *Journal of the American College of Surgeons*, 220(2), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2014.11.002>
- Wasterlain, A. S., Braun, H. J., & Dragoo, J. L. (2012). Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 22(1), 33–42. <https://doi.org/10.1053/j.oto.2011.11.001>
- Wu, Z., Vakalopoulos, K. A., Boersema, G. S. A., Kroese, L. F., Lam, K. H., van der Horst, P. H., ... Lange, J. F. (2014). The prevention of colorectal anastomotic leakage with tissue adhesives in a contaminated environment is associated with the presence of anti-inflammatory macrophages. *International Journal of Colorectal Disease*, 29(12), 1507–1516. <https://doi.org/10.1007/s00384-014-2012-x>
- Yamaguchi, R., Terashima, H., Yoneyama, S., Tadano, S., & Ohkohchi, N. (2012). Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *Journal of Surgical Research*, 173(2), 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.10.001>
- Yol, S., Tekin, A., Yilmaz, H., Küçükkartallar, T., Esen, H., Çağlayan, O., & Tatkan, Y. (2008). Effects of Platelet Rich Plasma on Colonic Anastomosis. *Journal of Surgical Research*, 146(2), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.05.015>
- Zhou, B., Ren, J., Ding, C., Wu, Y., Chen, J., Wang, G., ... Li, J. (2014). Protection of colonic anastomosis with platelet-rich plasma gel in the open abdomen. *Injury*, 45(5), 864–868. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.01.018>